动 物 学 研 究 2008，Aug. 29(4)：386-398 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research doi:10.3724/SP.J.1141.2008.04386

非晶状体βγ-晶状体蛋白与三叶因子蛋白复合物的细胞核转运及其选择性杀伤肿瘤细胞机制的研究

何英英[1,2,#]，刘树柏[1,2,#]，钱金桥[1,2,3]，李文辉[1]，张 云[1,*]

(1. 中国科学院昆明动物研究所 动物模型与人类疾病机理重点实验室，云南 昆明 650223；2. 中国科学院研究生院，北京 100049；3. 昆明医学院第一附属医院 麻醉科，云南 昆明 650032)

摘要：非晶状体βγ晶状体蛋白与三叶因子蛋白复合物(βγ-CAT)是从大蹼铃蟾（*Bombina maxima*）皮肤分泌物中分离的分子量为72 kDa的天然蛋白复合物。本研究通过激光共聚焦显微镜和Western blot分析βγ-CAT在人脐静脉内皮细胞(HUVEC)中的细胞核转运机制，以及βγ-CAT对多株肿瘤细胞(HCT116，HT29，A375，Hela，THP-1等)的细胞毒效应。结果表明：βγ-CAT的α亚基中含有典型的GTP/ATPase的保守结构模体Walker A和Walker B，体外检测到βγ-CAT具有GTP/ATP水解酶和GTP/ATP结合活性。在细胞核转运过程中，βγ-CAT 的α亚基和β亚基参与形成约150 kDa含有泛素化修饰信号的大分子复合物，且泛素化修饰信号和βγ-CAT 的α亚基和β亚基共定位于细胞内和融合于细胞核区域的转运囊泡小体中。βγ-CAT能够选择性的杀伤肿瘤细胞，诱导肿瘤细胞脱落和发生凋亡。上述结果为进一步深入研究βγ-CAT的细胞核转运和调节细胞功能的分子作用机制提供思路和线索。

关键词：非晶状体βγ-晶状体蛋白；三叶因子；非晶状体βγ-晶状体蛋白和三叶因子蛋白复合物；GTP/ATP 水解酶；肿瘤细胞脱落与凋亡；泛素化修饰；细胞核定位
中图分类号：Q959.5；Q51 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853-(2008)04-386-013

Mechanism of βγ-CAT Cell Nuclear Transportation and Selectively Killing of Tumor cells

HE Ying-ying[1,2,#]，LIU Shu-bai[1,2,#]，QIAN Jin-qiao[1,2,3]，LEE Wen-hui[1]，ZHANG Yun[1,*]

(1. *Biotoxin Units*，*Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms*，*Kunming Institute of Zoology*，*the Chinese Academy of Sciences*，*Kunming Yunnan* 650223，*China*；2. *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences*，*Beijing* 100049，*China*；3. *Department of Anesthesiology*，*the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College*，*Kunming Yunnan* 650032，*China*)

Abstract: βγ-CAT is a naturally existing protein complex of non-lens βγ-crystallin and trefoil factor, purified from *Bombina maxima* skin secretions. In HUVECs, βγ-CAT can be rapidly endocytosed via intracellular vacuole formation and translocated to the nucleus to regulate cell fuction. In this paper, we found that it contains conserved Walker B motifs (IILYDEPS, residues 6-13) and Walker A motifs (GQSLSGKS, residues 96-103) in the βγ-CAT α-subunit sequence. βγ-CAT showed potential NTP-binding and weak GTPase/ATPase activities *in vitro*. Through Western blotting analysis, we found that the α- and β-subunits of βγ-CAT participated in a 150 kDa SDS-stable protein complex formation, which also contained positive ubiquitination signals in the βγ-CAT treated HUVEC. Furthermore，under confocal microscopy, the immunofluorescence signals of ubiquitin and βγ-CAT subunits were co-localized in the vacuoles that were distributed in the cytoplasm and nucleus. In addition, βγ-CAT could induce several tumor cell's detachment and apoptosis, and selectively kill tumor cells. These findings provide a clue to understand the mechanism of βγ-CAT endocysis and nuclear transport, and give an insight to investigate the possible occurrence of similar molecule's cellular functions and action mechanisms of non-lens βγ-crystallins and trefoil factors in mammals.

Key words: Non-lens βγ-crystallin; Trefoil factor; βγ-CAT; GTP/ATPase; Tumor cells detachment and apoptosis; Ubiquitination; Nuclear targeting

---

收稿日期：2008-04-25；接受日期：2008-06-02
基金项目：国家自然基金(30630014；30570359)；中国科学院重要研究方向基金(KSCX2-YW-R-088)
[*]通讯作者（Corresponding author），E-mail: zhangy@mail.kiz.ac.cn
[#]并列第一作者:何英英(1979-)，女，博士，研究方向为天然活性蛋白和多肽的药理学研究，E-mail: peard_liu@hotmail.com；刘树柏(1978-)，男，博士，研究方向为天然活性蛋白和多肽的药理学研究，E-mail:liutonny@hotmail.com

三叶因子(trefoil factor family，TFF)为一类含有三叶因子结构域(因含有三个形似三叶草的环状结构而得名)的分泌型蛋白质。一个三叶因子结构域(trefoil factor domain,又称为P-Domain)为大约40个氨基酸残基组成的具有C-X9–10-C-X9-C-X4-C-C-X10-C(C代表半胱氨酸残基，X为任意氨基酸残基)序列特征的结构区域，其中6个半胱氨酸残基以1-5、2-4、3-6的模式形成三对保守的二硫键(Sands & Podolsky，1996；Thim 1997)。自从第一个三叶因子pS2/TFF1于1982年在哺乳动物肿瘤细胞MCF7筛选雌激素诱导的乳腺癌易感基因相关研究中被发现以来，不同类型的三叶因子不断的被发现，从此揭开了对这一家族蛋白质的相关研究(Maslov & Chunaev，1982；Wong et al，1999)。到目前为止，在两栖动物非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)和大蹼铃蟾(*Bombina maxima*)分别发现了含有一个三叶因子结构域的三叶因子xP1(Hauser & Hoffmann，1991)，含有两个三叶因子结构域的三叶因子xP2 (Hauser et al，1992)和Bm-TFF2(Zhang et al，2005)，含有三个三叶因子结构域的βγ-CAT的β亚基 (Liu et al，2008) 和含有四个三叶因子结构域的三叶因子xP4 (Hauser & Hoffmann，1991)。在哺乳动物中已经发现了三类三叶因子:TFF1，TFF2和TFF3。TFF1和TFF3含有一个三叶因子结构域，TFF2含有两个三叶因子结构域。三叶因子主要表达和分泌于表皮细胞的粘液腺，如胃肠消化道,支气管和尿道等表面。但是，在腺癌患者中，三叶因子高水平和异位表达(Suemori et al，1991；Labouvie et al，1997；Taupin & Podolsky，2003；Thim & May，2005)。研究表明，TFFs具有复杂多样的生物学效应，例如刺激细胞迁移，黏附，抑制肿瘤细胞生长，促进创伤修复及组织重建(Lefebvre et al，1996；Taupin & Podolsky，2003)。但是，三叶因子的详细分子作用机制尚不清楚。

晶状体蛋白最早为 Mörner (1893)发现于脊椎动物眼球晶状体中，作为一种水溶性结构蛋白，其含量占眼球晶状体总质量的 30%－35%，因其在眼球晶状体中广泛分布而命名为晶状体蛋白。晶状体蛋白分为α, β, γ晶状体三类，每一类晶状体蛋白由一系列蛋白组成一个超家族 (Graw，1997；Piatigorsky，1981；Bloemendal，1982)。β, γ-晶状体蛋白因含有相同的希腊钥匙结构模体(Greek key motifs)而将它们归为βγ–晶状体蛋白超家族。α, β, γ三类晶状体蛋白在基因结构, 表达调节模式和参与的相关疾病的发生等方面存在着很大的差别。眼球中βγ-晶状体蛋白的N-端和 C-端氨基酸的突变会导致眼球发生白内障(Graw，1997；Malinowski & Manski，1980)。βγ-晶状体蛋白在眼球的发育过程中可能参与调节眼球血管稳定, 再造和凋亡, 具体的作用机制和功能目前尚不清楚(Zhang et al，2005)。最近研究表明, 在眼球晶状体之外也检测到有α, β, γ三类晶状体蛋白的表达。非晶状体α-晶状体蛋白属于小热休克蛋白超家族, 具有自我激活的酶活性, 主要作为分子伴侣, 参与γ-晶状体基因的激活，与神经系统功能失调具有协同相关性(Ganea，2001；Narberhaus，2002；Reddy et al，2006)。非晶状体βγ-晶状体蛋白超家族蛋白从微生物到高等哺乳动物都有报道(Wistow & Piatigorsky，1988；Bhat，2004), 包括微生物来源的应急蛋白和高等哺乳动物中肿瘤相关蛋白, 例如 Protein S (Nelson & Zusman，1983)，Spherulin 3a (Nelson & Zusman，1983；Rosinke et al，1997)，来源于四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)的转运蛋白 Igr1(induced during granule regeneration) (Haddad et al，2002)，表皮分化特异蛋白(epidermis differentiation-specific proteins，EP37) (Takabatake et al，1992；Wistow et al，1995；Ogawa et al，1997)和哺乳动物中的黑色素瘤缺失蛋白(absent in melanoma 1，AIM1) (Ray et al，1997；Teichmann et al，1998)。研究发现 EP37 参与了蝾螈(*Cynops pyrrhogaster*)胚胎发育中的表皮，皮肤腺体和消化道上皮的发育和分化(Ogawa et al，1997；Ogawa et al，1998)。在哺乳动物中，Northern 印迹分析表明，黑色素瘤缺失蛋白 AIM1 在胚胎发生过程中受时空的调节，大量表达于毛囊轴区、假定的胚盘和成体的皮肤、肺、心脏和肝、肾等器官，而在黑色素细胞和黑色素细胞前体细胞上未检测到。黑色素瘤缺失蛋白 AIM1 在胚胎发育和正常皮肤组织中的大量表达提示了该蛋白质在胚胎发育和组织分化，以及正常皮肤中肿瘤抑制具有重要的功能(Ray et al，1997；Teichmann et al，1998)。但是, 目前对于脊椎动物中的非晶状体βγ–晶状体蛋白的生化特性, 功能和作用机制尚不清楚。

大蹼铃蟾(*Bombina maxima*)为一类中国西南山区特有的两栖动物，其生活环境非常恶劣，研究表明其皮肤分泌物对哺乳动物(例如小鼠)具有强烈致

死活性(Zhang，2006)。非晶状体βγ晶状体蛋白与三叶因子蛋白复合物(non-lens βγ-crystallin and trefoil factor complex，βγ-CAT)为一个从大蹼铃蟾皮肤分泌物中分离得到的全新的分子量为 72 kDa 的天然蛋白复合物(Liu et al，2008)。βγ-CAT 的α-亚基和β-亚基通过非共价键连接以$\alpha\beta_2$ 的分子形式存在。βγ-CAT 的α-亚基属于非晶状体βγ晶状体蛋白家族，与蝾螈(*Cynops pyrrhogaster*)表皮分化蛋白 EP37 和人源黑色素瘤缺失蛋白 AIM1 具有很高的序列相似度。βγ-CAT 的β-亚基含有三个三叶因子结构域，为世界上第一次报道，与人源三叶因子 hTFF2 和 hTFF3 具有很高的相似度(Liu et al，2008)。βγ-CAT 具有复杂多样的生物学功能。βγ-CAT 能够通过孔道形成作用在人源红细胞膜上形成孔径为 2.0 nm 的孔道，使红细胞内钾离子迅速外流引起胶体渗透压改变而溶血。Western blotting 分析表明βγ-CAT 的α-亚基能够在红细胞膜寡聚形成分子量大于 240 kDa 的大分子寡聚体(Liu et al，2008)。βγ-CAT 能够以囊泡化的方式被 HUVEC 内吞并迅速转运到细胞核，激活基因表达转录(Liu et al，2008)。但是，详细的分子作用机制尚不清楚。本研究中，通过激光共聚焦显微镜和 Western blot 分析βγ-CAT 在 HUVEC 中的细胞核转运相关机制。同时，通过 MTT 测试，流式细胞仪和 Caspases 活性分析，探讨了βγ-CAT 对多种肿瘤细胞的生物学效应。这些结果为进一步深入研究βγ-CAT 在细胞内的转运，细胞核定位和调节细胞基因表达的分子作用机制提供了线索和思路。同时，对于揭示高等脊椎动物中非晶状体βγ-晶状体和三叶因子蛋白生理功能具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 实验材料和试剂

大蹼铃蟾皮肤分泌物冻干粉来源于中科院昆明动物研究所；HUVEC 为本实验室按 Liu et al (2008)所述的方法通过原代培养而得的 2—4 代细胞；肿瘤细胞株 HCT116，AGS，K562 购自中国科学院上海细胞库；肿瘤细胞株 Hela，HT29，MCF-7，THP-1，A375，Hacat 购自中国科学院昆明动物所细胞库；各种培养基(M199，DMEM，RP1640)和胎牛血清均购自美国 GIBCO 公司；各种规格的细胞培养瓶(25 cm^2 和 75 cm^2)和细胞培养皿(96 孔细胞培养板和 35 mm 细胞培养皿)购自美国 Corning 公司；血栓调节蛋白抗体，荧光素 FITC 标记的羊抗兔抗体和低密度脂蛋白抗体购自美国 Invitrogen 公司；过氧化物酶偶联的羊抗兔和羊抗鼠多克隆抗体购自 Santa Cruze；鼠抗人的 ubiquitin 单克隆抗体购自 Abcam；兔源抗βγ-CAT，βγ-CAT-α和βγ-CAT-β亚基的多克隆抗体为本实验室制备(Liu et al，2008)；胶原酶，胰酶，青霉素，链霉素，四环素，台盼蓝，MTT，PI，Hoechst33342，Nonidet P-40，Na_3VO_4，leupeptin，aprotinin，pepstatin，PMSF 和胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司；各种生化试剂(EDTA，Tris-Base，DMSO，牛血清白蛋白(BSA)，丙酮，Triton X-100，NaCl，KCl，$NaHCO_3$，KH_2PO_4)均为 Amersco 进口分装；半胱氨酸蛋白酶(Caspases)活性检测试剂盒购自 Calbiochem；TNP-GTP/ATP 购自 Molecular Probes；GTPase/ATPase 比色试剂盒购自 Innova Biosciences；PVDF 膜购自 Millipore；SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate(ECL)化学发光底物购自 PIERCE；倒置相差显微镜(Olympus，USA)，LSM510 META 倒置激光共聚焦显微镜(Zeiss，German)。

1.2 天然βγ-CAT 的分离纯化

天然βγ-CAT 的分离纯化流程详见(Liu et al，2008)，其简略步骤如下：取 0.5 g 皮肤分泌物冻干粉溶于 10.0 mL 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.3，含 150 mmol/L NaCl 和 5 mmol/L EDTA)，4 ℃透析过夜。经离心处理(5000 r/min，4℃，20 min)，取上清液按照 Liu et al (2008)所报道的分离纯化流程，分别上样于预先平衡好的 DEAE Sephadex A-50 离子层析柱(Pharmacia，2.6 cm×50 cm)，AKTA Sephadex superfine G-100 分子筛层析柱(2.6 cm×100 cm，流速为 1.0 mL/min)和 AKTA Mono-Q HR5/5 阴离子层析柱(20 mmol/L Tris-HCl，pH8.8，4℃透析 24 h)，根据 280 nm 的光吸收值收集各分离峰。纯化的天然βγ-CAT 小量分装后于-20℃低温保存备用。采用牛血清白蛋白作为浓度梯度标准，测定标准曲线，纯化的天然βγ-CAT 根据 BIO-RAD 公司的 PROTEIN ASSAY KIT 进行蛋白定量。

1.3 βγ-CAT 核苷酸结合活性及 GTPase/ATPase 活性检测

采用 GTP /ATP 的荧光类似物 TNP-GTP/TNP-ATP(Hiratsuka & Uchida，1973)体外检测βγ-CAT 的核苷酸结合活性。具体实验流程为：将βγ-CAT 分别与 TNP-GTP 和 TNP-ATP (10 μmol/L，溶解于含 20%(v/v)甘油的 50 mmol/L Tris-HCl，pH7.8)在室温

孵育 5 min，荧光分光光度仪(Perkin Elmer LS50B)进行荧光激发检测(激发波长为 410 nm，发射波长为 565—600 nm)。βγ-CAT 与核苷酸类似物结合能力通过 TNP-GTP/ATP 在 575 nm 荧光发射强度的增加来判断。βγ-CAT 的 GTPase/ATPase 活性通过 GTPase/ATPase 比色试剂盒(Innova Biosciences，UK，high sensitivity) 体外测定，详细流程参照说明书指南进行，酶活力单位为 nmol/min。

1.4 细胞培养

HUVECs 原代培养参照 Liu et al (2008)的方法建立，在所有相关实验中所用 HUVECs 均为 2－4 代。贴壁细胞(HUVEC，HCT116，HT29，AGS，Hela，MCF-7，A375，Hacat)在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养；THP-1，K562 为悬浮细胞,置于含 10%胎牛血清的 RP1640 培养基培养。待贴壁细胞长至 90%满度时，采用 0.25%胰蛋白酶溶液消化成单细胞悬浮液，调整细胞数目为 2.5×10^5 cell/mL，分别将 HUVEC，HCT116，HT29，AGS，Hela，MCF-7，A375 和 Hacat 细胞接种于 96 孔细胞培养板(200 μL/well)；将 HUVEC，HCT116，HT29 和 A375 细胞接种于 35 mm 细胞培养皿(1.0 mL/well)；将 HUVEC 和 HCT116 细胞接种于 25 cm^2 细胞培养瓶(3.0 mL/bottle)。悬浮培养细胞 THP-1 和 K562 直接调整细胞数目为 2.5×10^5 cell/mL，接种于 96 孔细胞培养板(200 μL/well)。所有细胞置 37 ℃，5% CO_2 培养箱中培养，持续观察无任何污染且待细胞长至 90%满度，通过倒置显微镜观察筛选贴壁和生长状态良好的培养细胞进行实验，实验前更换新鲜培养基并稳定 2 h。

1.5 MTT 法检测βγ-CAT 对肿瘤细胞株的细胞毒活性

采用 MTT 法(Alley et al，1988)体外检测βγ-CAT 对多种肿瘤细胞株的细胞毒活性。具体实验流程为：加入不同浓度的βγ-CAT(0－100 nmol/L)于 37℃孵育 30 min，离心处理(1000 r/min，5 min)弃上清，用 PBS(200 μL/well)洗涤一次，离心处理弃上清，然后加入[(180 μL 培养基+20 μL 5 mg/mL MTT)/well]含 MTT 的新鲜培养基，37℃继续培养 4 h。终止培养后,离心处理弃孔内培养液上清，PBS(200 μL/well)洗涤一次再离心处理弃上清，加入 DMSO(150 μL/well)，置摇床上低速振荡 10 min，采用酶标仪于 595 nm 检测各孔的吸光值。实验中分别设立对照孔(未加药物的细胞空白孔)和凋零孔(未接种细胞的空白孔)，每孔设定 3 个复孔，每个剂量独立生物学重复 3 次，细胞的存活率=[(对照孔－凋零孔)－(实验孔－凋零孔)]/(对照孔－凋零孔)×100%。

1.6 体外检测βγ-CAT 诱导肿瘤细胞脱落活性

不同浓度的βγ-CAT(0 － 100 nmol/L) 处理 HUVEC，HCT116，HT29 和 A375 细胞(35 mm，37 ℃孵育 2 h，每个浓度设置 3 个复孔)。孵育结束后收集培养基上清于 15 mL 离心管 A 中，PBS 缓冲液轻柔洗涤 35 mm 两次,合并于离心管 A 中，定容到 2 mL。反复吹打混匀细胞后，经 0.4%台盼兰染色，倒置显微镜计数。加入 0.25%胰酶溶液消化 35 mm 细胞培养皿中剩余的贴壁细胞(37℃，5 min)，然后收集消化好的细胞于 15 mL 离心管 B。PBS 缓冲液清洗 35 mm 细胞培养皿两次，并入离心管 B 中，定容到 2 mL。反复吹打混匀细胞后，经 0.4%台盼兰染色，倒置显微镜计数。脱落细胞百分比=管 A 中的细胞总数/(管 A 中的细胞数+管 B 中的细胞数)×100%。该实验独立重复 3 次，计算细胞脱落率。

1.7 βγ-CAT 诱导 HCT116 细胞凋亡活性检测

流式细胞仪分析βγ-CAT 诱导肿瘤细胞 HCT116 发生细胞凋亡的活性，具体实验流程为：加入不同浓度的βγ-CAT(0－100 nmol/L)处理肿瘤细胞 HCT116(25 cm^2，37℃孵育 2 h)，然后收集上层培养基，冰上预冷的 PBS 清洗贴壁细胞两次，收集后与上层培养基合并；采用 0.25%胰蛋白酶溶液消化剩余贴壁细胞(37℃，5 min)，收集细胞悬液，与上层培养基合并，离心处理(1000 r/min，5 min)弃上清液，采用冰上预冷的 PBS(5 mL)清洗一次，离心处理(1000 r/min，5 min)弃上清液。然后加入 Hoechst33342 染色液(10 μg/mL)冰上染色 10 min，再加入 0.5 mL PI 染液(100 μg/mL，含 RNA 酶 100 μg/mL)冰上复染 10 min。染色处理好的样品通过流式细胞仪(FACSVantage SE，Becton Dickinson)进行分析。

半胱氨酸蛋白酶(Caspases)活性检测参照(Bossenmeyer-Pourie et al，2002)所叙述的方法进行，具体实验流程为：加入不同浓度的βγ-CAT(0－100 nmol/L)处理肿瘤细胞 HCT116(25 cm^2，37℃孵育 2 h)。样品分为两个平行实验组：A 组中仅检测脱落细胞中 Caspases 活性；B 组中检测总细胞中 Caspases 活性。A 组在孵育结束后，收集上层培养基，采用冰上预冷的 PBS 清洗两次，与上层培养基合并，离心处理(1000 r/min，5 min)弃上清液，加入细胞裂解液于冰上裂解 30 min。B 组在孵育结束后，

收集合并培养基中悬浮细胞和贴壁细胞，加入细胞裂解液于冰上裂解 30 min。采用 BIO-RAD 公司的 Protein assay kit 进行细胞总蛋白质的定量测定。调整待测样品的总蛋白质浓度一致，分别加入底物于37℃孵育 2 h，通过荧光分光光度计(Perkin Elmer LS50B)检测样品中 Caspases 活性。Caspases 活性定义为每 g 总蛋白所引起的底物每个小时的最大荧光净增量。

1.8 Western 印迹分析

βγ-CAT(10 nmol/L)处理 HUVEC (37℃，孵育 30 min)后，吸去培养基并用冰上预冷的 PBS 洗涤两次贴壁细胞。培养基上清经离心(14 000 *g*，5 min，4 ℃)弃上清，经预冷的 PBS 洗涤两次后与贴壁细胞一起加入细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl，pH7.4，150 mmol/L NaCl，5 mmol/L EDTA，1% Nonidet P-40，1 mmol/L Na_3VO_4，10 μmol/L leupeptin，10 μmol/L aprotinin，10 μmol/L pepstatin 和 1 mmol/L PMSF)于冰上裂解 15 min；然后加入含 2%(w/v)SDS 的还原电泳上样缓冲液于 37℃处理 30 min，进行 SDS-PAGE 梯度(5%－15%)电泳胶电泳分析(120V，2h)。电泳结束后电转移至 PVDF 膜(Towbin et al，1979)，PVDF 膜采用 5% BSA 于 4℃封闭过夜。然后分别与不同的一抗孵育[本实验室制备的抗βγ-CAT，βγ-CAT-α亚基和βγ-CAT-β亚基的兔源多克隆抗体(500 倍稀释)，鼠源单克隆抗人 ubiquitin 抗体(Abcam，1000 倍稀释)]；分别使用过氧化物酶偶联的羊抗兔/羊抗鼠抗体检测一抗(Abcam，5000 倍稀释)，采用化学发光底物(SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate，PIERCE)检测信号，通过 X-胶片显影。

1.9 激光共聚焦显微镜观察

通过激光共聚焦显微镜观察βγ-CAT在HUVEC的细胞核转运，具体实验流程为：将经0.25%胰蛋白酶溶液消化的1 mL HUVEC单细胞悬液(2.5×10^4 cell/mL) 接种于灭菌处理的盖玻片上，置37℃，5% CO_2培养箱中培养过夜。待细胞贴壁稳定后，更换新鲜培养基稳定2h，加入βγ-CAT(10 nmol/L)于37℃孵育10 min。然后弃上清培养基，冰上预冷的PBS清洗两次，4%多聚甲醛于室温下固定20 min。弃多聚甲醛固定液，冰上预冷的PBS清洗两次，采用含0.01% NP-40的PBS室温下进行穿透处理10 min，PBS清洗两次，采用2% BSA的PBS 4℃封闭过夜。抗体孵育时，先加入鼠源单克隆抗人ubiquitin抗体(Abcam，1000倍稀释)室温下孵育1 h，采用含2% BSA的PBS清洗三次，加入Cy3标记的羊抗鼠二抗，室温下孵育1h。采用含2% BSA的PBS清洗3次，再分别加入FITC标记的抗βγ-CAT-α亚基和βγ-CAT-β亚基的抗体(500倍稀释)100 μL，室温下避光孵育1 h，冰上预冷的PBS清洗三次后采用Hoechst 33342(5 μg/mL，室温下避光孵育5 min)进行细胞核染色，洗去多余的Hoechst33342，封片后于激光共聚焦显微镜下观察。

1.10 统计学分析

实验数据表示为平均值±标准误。实验数据采用单因素*t*-test进行统计学分析，差异显著性水平设置为$P<0.05$。

2 结 果

2.1 βγ-CAT 具有核苷酸结合活性及 GTPase/ATPase 活性

参考经典的 GTPase/ATPase 的保守结构模体 Walker A 和 Walker B 的序列特征(Walker et al，1982)，通过序列分析表明βγ-CAT 的α亚基中含有典型的 GTPase/ATPase 的保守结构模体 Walker A 和 Walker B(图 1A)。在体外实验体系中βγ-CAT 能够分别与 GTP/ATP 的类似物 TNP-GTP/TNP-ATP 结合。βγ-CAT 与 TNP-GTP 的体外结合具有浓度依赖效应，随着βγ-CAT 的浓度增大，检测到的荧光强度越大(图 1B)。同时，在体外检测到βγ-CAT 具有 GTPase/ATPase 活性，其酶活力分别为 0.23 nmol/L/min 和 0.15 nmol/L/min (图 1B)。

2.2 βγ-CAT 在 HUVEC 细胞中的细胞核转运及泛素化修饰

βγ-CAT(10 nmol/L)处理 HUVEC(37℃，孵育 30 min)，Western blot 分析表明βγ-CAT 在 HUVEC 的细胞核转运过程中，βγ-CAT 的α和β亚基均参与形成分子量约为 150 kDa 的大分子蛋白复合物(图 2A)。同时，在 150 kDa 的大分子复合物中检测到阳性泛素化修饰信号(图 2B)。在激光共聚焦显微镜下，分别采用 FITC 标记的抗βγ-CAT-α亚基和βγ-CAT-β亚基的抗体和Cy3标记的抗泛素化的单克隆抗体作为探针进行观察。结果表明，βγ-CAT 被 HUVEC 内吞入胞后，分布于细胞内的囊泡状结构中(图 3 中 B1，C1，E1，F1，绿色荧光信号)，在部分囊泡转运小体中清晰的检测到阳性泛素化修饰

信号(图 3 中 B2，C2，E2，F2，红色荧光信号)，并与囊泡转运小体中βγ-CAT 的α和β亚基的荧光信号重合(图 3 中 B3，C3，E3，F3，如箭头所示)向细胞核转运，部分囊泡融合到细胞核中(图 3 中 C3 和 F3，如箭头所示)。

2.3　βγ-CAT 具有选择性杀伤肿瘤细胞的细胞毒活性

如图 4 所示，βγ-CAT 能够选择性的杀伤多种肿瘤细胞，其中肿瘤细胞 HCT116 最敏感，在βγ-CAT(5 nmol/L) 处理 30 min 后细胞存活率下降到 43.22±3.22%，其 CC_{50} 约为 3 nmol/L。肿瘤细胞 THP-1，HT29，MCF-7 和 Hela 对βγ-CAT 作用敏感度较低，CC_{50} 分别为 50 nmol/L (THP-1)，75 nmol/L(HT29)和 85 nmol/L (MCF-7)，100 nmol/L (Hela)。βγ-CAT 对肿瘤细胞 AGS，Hacat，A375，K562 在 100 nmol/L 浓度下处理 30 min 后，未观察到明显的细胞毒效应。

2.4　βγ-CAT 诱导肿瘤细胞脱落

结果表明βγ-CAT 在体外能够浓度依赖(5－100 nmol/L)的诱导贴壁肿瘤细胞发生脱落。倒置显微镜观察发现，βγ-CAT 处理后，HCT116，HT29 和 A375 的贴壁细胞数量大大减少，细胞脱落后悬浮于培养基中。如图 5 所示，不同的肿瘤细胞株对βγ-CAT 表现出不同的敏感度，其中 HCT116 最敏感(EC_{50}

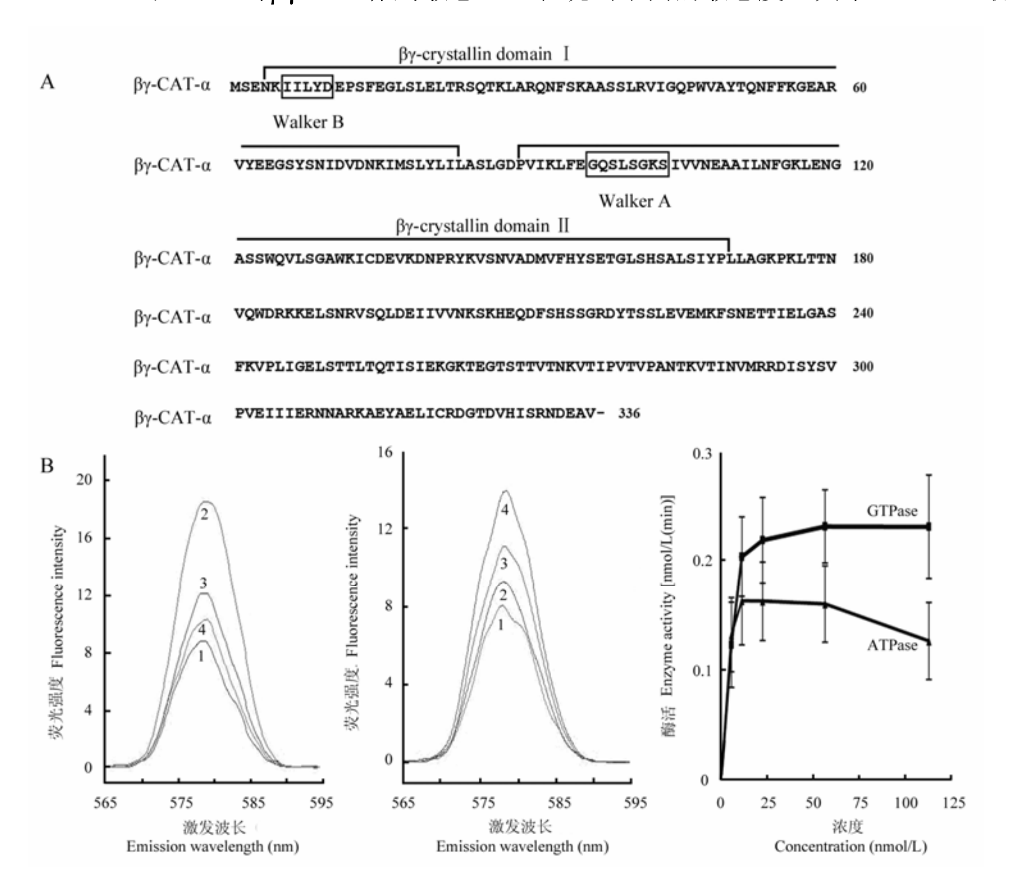


图 1　体外测定βγ-CAT 的核苷酸结合活性和 GTPase/ATPase 活性

Fig.1 Determined the nucleotide binding and GTPase/ATPase activity of βγ-CAT *in vitro*

A：βγ-CAT 的α-亚基序列中 Walker A 和 Walker B 结构模体的确定；B：左栏和中间栏为体外测定βγ-CAT 的核苷酸结合活性（1，control；2，170 nmol/L βγ-CAT；3，250 nmol/L βγ-CAT；4，340 nmol/L βγ-CAT），图中结果为三次重复试验的代表，右栏为体外测定βγ-CAT 的 GTPase/ATPase 的水解活性(*n*=6)。

A: Identified the Walker A and Walker B motifs in the βγ-CAT α-subunit; B: Left and middle lanes indicate the nucleotide binding property of βγ-CAT (Spectrum 1，control; spectra 2，3 and 4，in the presence of βγ-CAT 170 nmol/L，250 nmol/L and 340 nmol/L，respectively)，the result was the representative of three independent tests. Right lane，determined the GTP/ATP hydrolyzing activity of βγ-CAT *in vitro* (*n*=6).

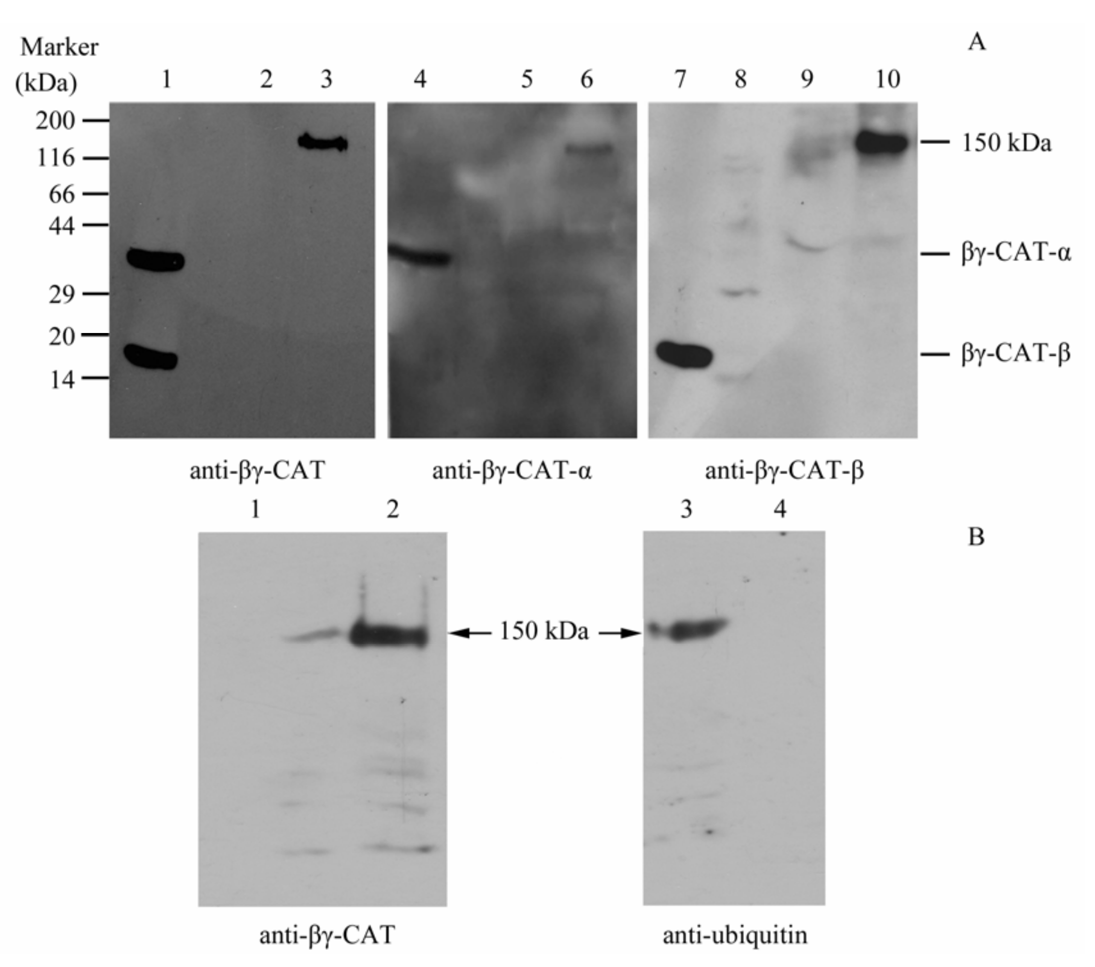


图 2 Western blot 分析βγ−CAT 在 HUVECs 中内吞入胞形成的大分子复合体和泛素化修饰

Fig. 2 Western blotting analysis of SDS-stable complex formation and ubiquitination of βγ-CAT during endocytosis in HUVECs

A：150 kDa SDS 稳定的大分子复合体的形成。1，4，7 为βγ-CAT 对照；2，5，9 为 HUVECs 阴性对照；3，6，10 为βγ-CAT(25 nmol/L，30 min)处理的 HUVECs；8 为分子量标准；B：泛素化修饰信号的检测。1，4 为 HUVECs 阴性对照；2，3 为βγ-CAT(25 nmol/L，30 min)处理的 HUVECs。150 kDa 大分子复合体由箭头所指。

A: 150 kDa SDS-stable complex formation. Lanes1, 4, 7 present βγ-CAT control; lanes 2, 5, 9 present HUVECs negative control；lanes 3，6，10 present HUVECs treated with βγ-CAT (25 nmol/L) for 30 min；lane 8 is standard protein marker. B: Ubiquitination signals in 150-kDa complex. Lanes 1, 4 present HUVECs negative control; lanes 2, 3 present HUVECs treated with βγ-CAT (25 nmol/L). The 150-kDa complex is marked by an arrow.

约为 10 nmol/L)，而 HT29 和 A375 的敏感性较差，100 nmol/L βγ-CAT 处理 2 h，仅有 40%的细胞脱落。

2.5 βγ-CAT 诱导肿瘤细胞 HCT116 发生凋亡

结果表明βγ-CAT 能够诱导肿瘤细胞 HCT116 发生凋亡。如图 6A 中所示，βγ-CAT(5—100 nmol/L，2 h)处理 HCT116 后，在流式细胞仪上通过 Hoechst/PI 双染色分析法检测到肿瘤细胞 HCT116 浓度依赖的发生凋亡。βγ-CAT(5 nmol/L)处理能够引起 77.87±3.65%的 HCT116 细胞发生凋亡。随着βγ-CAT 剂量的增加(25 nmol/L 和 100 nmol/L)，正常细胞数目显著减少，凋亡小体数目明显增加(图 6A 中位于第三象限横线下区域，箭头所示)。同时，在βγ-CAT 处理引起的 HCT116 脱落细胞中检测到 Caspase-1，-2，-6，-8，-9 被显著激活(如图 6B 所示，*P*<0.05)。

3 讨 论

孔道形成蛋白(pore-forming proteins，PFPs)为一类自然界中广泛分布于真核生物和原核生物中的能够在细胞表面形成孔道的蛋白质(Parker & Feil，2005)，例如哺乳动物中的补体，细胞毒T-细胞分泌的穿孔素，细胞凋亡相关的BCL2家族蛋白，

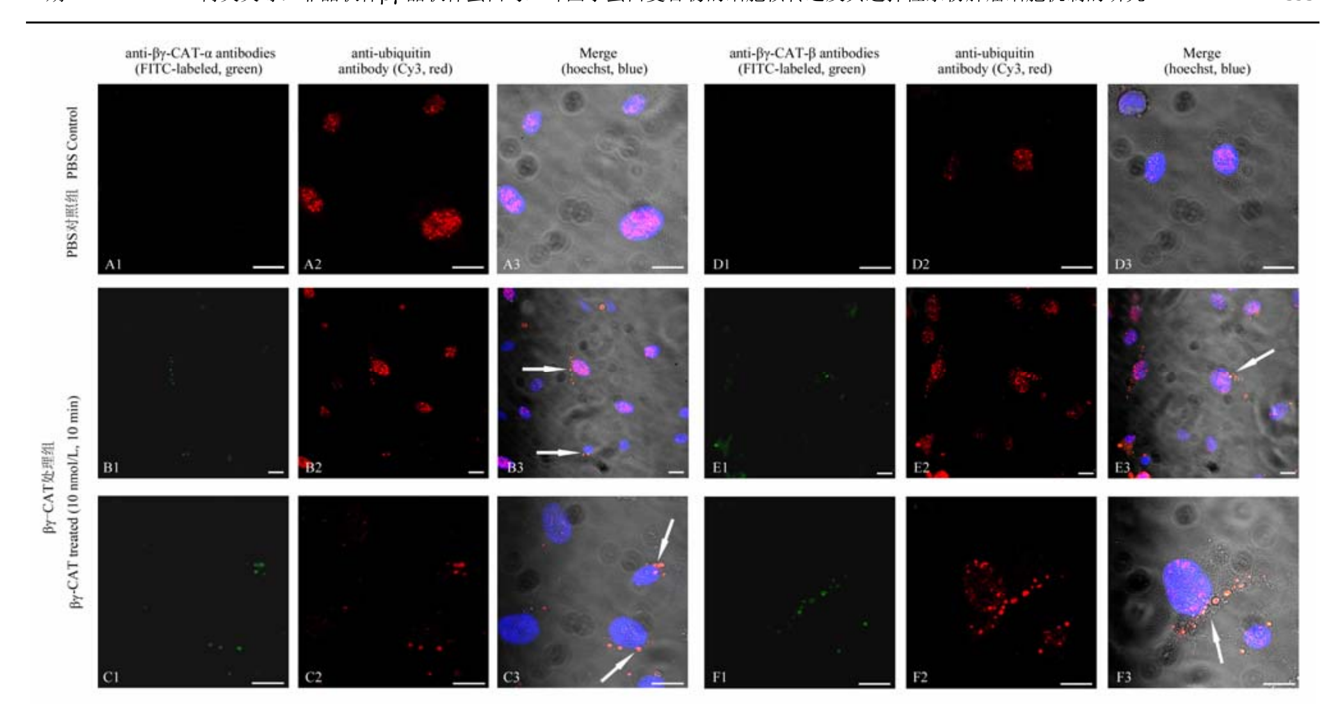


图 3　免疫荧光分析泛素化修饰信号和βγ-CAT 的α和β亚基在 HUVEC 中的共定位

Fig. 3　Co-localization of ubiquitin signals with βγ-CAT α-/β- subunits in big vacuoles of HUVECs

A1-A3 和 D1-D3 为 PBS 处理的对照组；B1-B3，C1-C3，E1-E3，F1-F3 为βγ-CAT 处理的细胞。A1, B1, C1, D1, E1, F1 分别为经 FITC 标记(绿色荧光)的βγ-CAT 的α和β亚基的抗体检测βγ-CAT 的α和β亚基在细胞内的分布；A2, B2, C2, D2, E2, F2 为由 Cy3 标记的羊抗鼠二抗检测(红色荧光)检测泛素化修饰信号；A3, B3, C3, D3, E3, F3 为红绿荧光通道和明场叠加。箭头所指为泛素化修饰信号和βγ-CAT 的α和β亚基的共定位。Hoechst 染液复染细胞核，图中标示比例尺为 20μm。

A1-A3 and D1-D3，cells were treated with PBS. B1-B3，C1-C3, E1-E3 and F1-F3, cells were treated with 10nmol/L βγ-CAT at 37°C for 10min. A1, B1 and C1 were detected with FITC-labeled-antibodies against α-subunit (green). D1, E1 and F1 were detected with FITC-labeled-antibodies against β-subunit (green). A2, B2, C2, D2, E2 and F2 were detected with rabbit monocloal anti-ubiquitin antibody (red). A3, B3, C3, D3, E3 and F3 were merged with a bright view. B2, D2, F2 and H2 were merged with a bright view. An overlap between the two antigens was yellow (arrows indicated in B3, C3, E3 and F3). Cell nucleus was stained by Hoechst. Scale bars equal to 20μm.

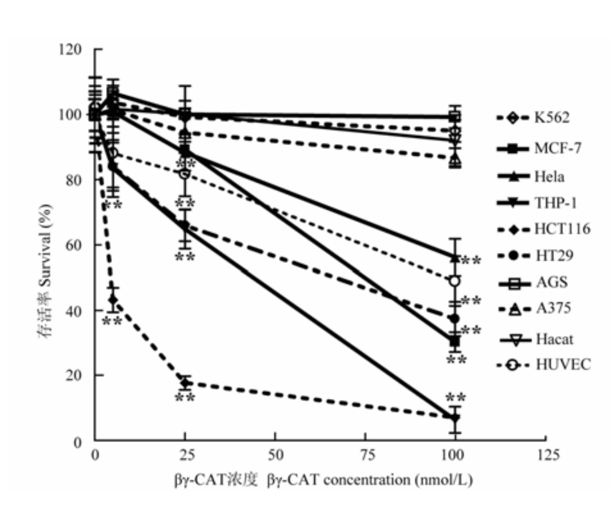


图 4　MTT 法检测βγ-CAT 对不同肿瘤细胞株的选择性杀伤作用

Fig.4　Cell viability of different tumor cell lines after treated with βγ-CAT as determined by MTT assay

结果表示为平均值±标准误(**P<0.01)。

Data were expressed as means±SEM of triplicate measurements (**P<0.01).

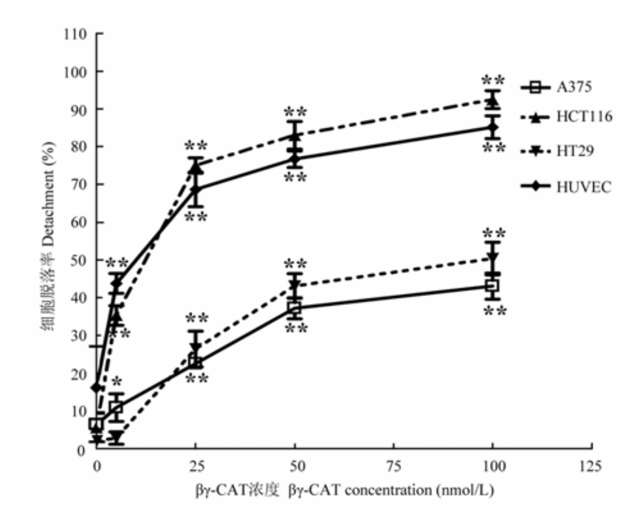


图 5　βγ-CAT 诱导肿瘤细胞(HUVEC，A375，HCT116，HT29)脱落

Fig.5　Detachment of cancer cells (HUVEC, A375, HCT116, HT29) induced by βγ-CAT

**P<0.01.

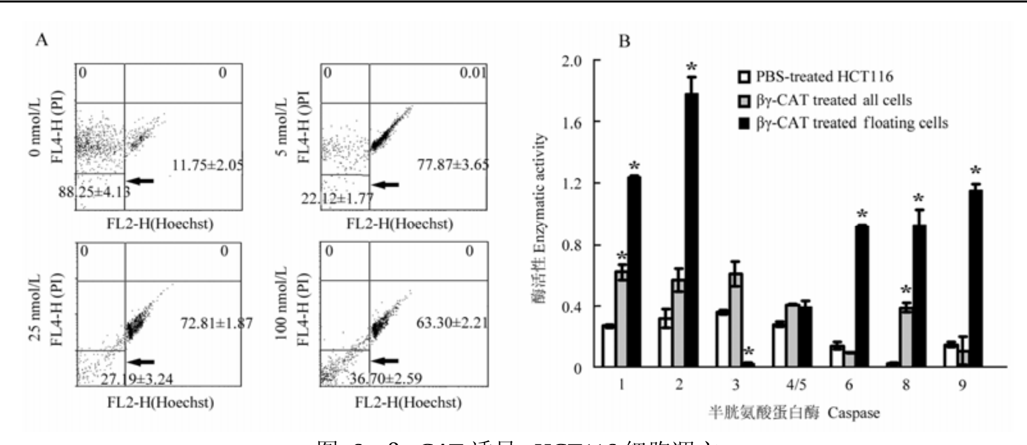


图 6 βγ-CAT 诱导 zHCT116 细胞凋亡

Fig.6 Cell apoptosis of HCT116 induced by βγ-CAT

A：Hoechst33342/PI 双染法流式检测。第四象限表示凋亡小体的含量；B) βγ-CAT 处理后的 HCT116 细胞 Caspase 酶活性测定。白色栏: PBS 处理的对照细胞裂解液。灰色栏，βγ-CAT 处理后的 HCT116 全细胞裂解液。黑色栏，βγ-CAT 处理后的 HCT116 脱落细胞裂解液。结果表示为平均值±标准误(*P<0.01)。

A: Apoptosis of HCT116 detected using Hoechst33342/PI by flow cytometry. Cell debris was under the line in the lower left quadrant；B: Activated caspase activities of HCT116 cells after treated with βγ-CAT. White columns present PBS treated cells；gray columns present the whole βγ-CAT treated. cells; black columns present the floating cells after βγ-CAT treatment. Data were expressed as means ± SEM of triplicate measurements (*P<0.01).

金色葡萄球菌分泌的α-溶血素和产气芽孢杆菌(*Aeromonas hydrophila*)分泌的Aerolysin (Tomita et al，2004；Parker & Feil，2005)。βγ-CAT的α-亚基在一级序列上由两部分组成:N-端区域含有由四个希腊钥匙模体组成的两个βγ晶状体结构域 (第1-170个氨基酸残基) (Liu et al，2008)。已有文献报道β晶状体蛋白具有从单体向多聚体相互转化的能力(Jaenicke & Slingsby，2001)，粘球菌分泌的非晶状体βγ晶状体蛋白S能够在应急状态下通过寡聚化形成保护性蛋白衣壳，保护细菌度过恶劣环境(Inouye et al，1979)。C-端区域含有(第173-287个氨基酸残基)与细菌(*Clostridium perfringens*)孔道形成蛋白毒素ETX(epsilon toxin)中孔道形成结构域(第118-209个氨基酸残基)高度相似的结构域(Liu et al，2008)。因此，βγ-CAT的α-亚基在结构上具备了孔道形成蛋白所需的结构特征。研究表明，βγ-CAT能够以囊泡化的方式被HUVEC内吞入胞，并迅速运输到细胞核中(βγ-CAT处理10 min，在部分细胞中即可观察到)调节细胞的基因表达。βγ-CAT在不同的剂量下，能够引起HUVEC不同的生物学效应。在低剂量下(25－50 pmol/L)，βγ-CAT能够引起HUVEC的伤口修复和细胞迁移活性;在高剂量下(5－100 nmol/L)，βγ-CAT能够诱导HUVEC发生脱落和选择性凋亡。选择性阻断βγ-CAT囊泡化的过程，能够部分抑制βγ-CAT诱导的HUVEC脱落，表明βγ-CAT通过转运到细胞核内来调节HUVEC的细胞功能。在这一点上，βγ-CAT与一些典型的细菌和植物来源的孔道形成蛋白毒素的作用很相似。这些孔道形成蛋白在细胞膜上形成孔道后能够诱导细胞内吞，通过内吞囊泡逆行转运到特定的亚细胞器靶点发挥作用(Wang et al, 2008), 例如细菌来源的腺甘酸环化酶毒素(Adenylate cyclase toxin)和志贺毒素(Shiga toxin)内吞入细胞后, 特异的作用于内质网(Sandvig & van Deurs，2005；Ladant & Ullmann，1999；Sandvig & van Deurs，2000)；幽门螺旋杆菌囊泡化毒素VacA转运到线粒体诱导细胞凋亡(Cover & Blanke，2005)。但是，目前关于βγ-CAT在HUVEC中的内吞入胞，细胞核转运和转录激活，调节细胞功能等相关的精细分子作用机制还很不清楚。

在本研究中，首先通过序列分析发现βγ-CAT的α亚基中含有典型的 GTP/ATPase 的保守结构模体 Walker A 和 Walker B。在体外实验体系中检测到βγ-CAT 具有微弱的 GTPase 和 ATPase 的活性，分别为 0.23 nmol/L/min 和 0.15 nmol/L/min。同时βγ-CAT 能够与 GTP/ATP 的类似物 TNP-GTP/TNP-ATP 在体外结合，表明βγ-CAT 具有潜在的GTP/ATP 结合活性(图 1A－B)。这些结果提示βγ-CAT 可能为一类全新的 GTP/ATPase，这是第一次报道高等脊椎动物来源的非晶状体βγ晶状体蛋白具有潜在的 GTP/ATPase 和 GTP/ATP 结合活性。在体外实验体系中，随着浓度的增加，βγ-CAT 与

ATP 类似物 TNP-ATP 的结合反而降低与,而βγ-CAT 与 GTP 类似物 TNP-GTP 的结合相应的增加。我们推测可能是由于体外实验体系微环境与细胞内囊泡小体微环境存在很大的差别,βγ-CAT 在体外测试体系中的折叠构象与细胞内的折叠构象不同，以及βγ-CAT 与 TNP-ATP 和 TNP-GTP 的结合能力的差异所导致。结合βγ-CAT 具有孔道形成蛋白的结构特点，βγ-CAT 与 ATP 和 GTP 的不同结合特性强烈提示βγ-CAT 可能存在两中不同的构象来实现与 ATP 和 GTP 的结合，从而发挥不同的功能，例如βγ-CAT 可能以构象 A 与 ATP 结合活性，通过 ATPase 活性水解 ATP，在细胞内囊泡转运过程中提供转运动力；到达细胞核区域后经过构象变化，βγ-CAT 可能以构象 B 的形式与 GTP 结合，通过 GTPase 活性水解 GTP，调节基因转录和表达。因此下一步的研究将尝试在细胞内分析βγ-CAT 的 GTP/ATPase 水解活性及 GTP/ATP 结合活性对βγ-CAT 的细胞内转运和调节基因表达中发挥的作用及其相应的分子作用机制。

高等真核生物中，细胞内泛素化修饰(ubiquitination)信号具有多种功能，例如多泛素化修饰信号认为是蛋白酶体降解蛋白的信号，单泛素化修饰信号主要参与了其他不依赖于蛋白酶体降解的重要的细胞生理功能，例如介导细胞外分子内吞，转运到细胞核调节基因表达(Haglund et al，2003)。最近研究表明，蛋白激素，生长因子和细胞因子可通过单泛素化修饰，经过一系列信号分子的调节，能够直接转运到细胞核，调节细胞基因表达，发挥重要的生理作用(Belting et al，2005)。例如，成纤维生长因子(fibroblast growth factors，FGFs)，血小板生长因子(platelet derived growth factors，PDGF)，表皮生长因子(epithelial growth factors，EGF)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factors，VEGF)结合受体后,经过单泛素化修饰，被细胞内吞后直接转运到细胞核，调节基因表达，刺激细胞生长，增殖和分化，从而在胚胎发育和组织再生等生理过程中发挥重要作用(Keresztes & Boonstra，1999；Olsnes et al，2003)。在本研究中，βγ-CAT(10 nmol/L)37 ℃ 处理 HUVEC 30 min，Western blot 分析发现βγ-CAT 的α亚基和β亚基参与形成约 150 kDa 的大分子复合物。这与在人红细胞膜上只有βγ-CAT 的α-亚基参与形成分子量大于 240 kDa 的寡聚体明显不同，表明βγ-CAT 在红细胞(无核细胞)和人脐带静脉内皮细胞(有核细胞)两种不同类型的细胞上采取了不同的作用机制。另外，在含有βγ-CAT 的α亚基和β亚基的 150 kDa 的大分子复合物中 Western blot 检测到阳性的泛素化修饰信号(图 2B)。通过激光共聚焦显微镜观察发现部分泛素化修饰信号和βγ-CAT 的α亚基和β亚基的抗体荧光信号分别重合，分布于细胞内和融合于细胞核区域的转运囊泡小体中(图 3)。这些结果提示泛素化修饰信号可能在βγ-CA 内吞入胞和细胞核转运过程中起到重要的作用。在研究中，我们曾尝试采用鼠源单克隆泛素化抗体对 150 kDa 的大分子复合物进行免疫共沉淀，但是没有成功。因此，在下一步的相关研究中，需要通过各种分子生物学和细胞生物学研究手段，分析泛素化修饰信号在βγ-CAT 内吞入胞和细胞核转运过程中所起到的作用和相关的分子调节机制，例如将 HUVEC 中与泛素化修饰的酶用 siRNA 的手段敲掉，分析对βγ-CAT 内吞入胞和细胞核转运的影响，以及尝试用抗不同表位的抗体，通过免疫共沉淀来分析 150 kDa 大分子复合物中的蛋白组成。

前期研究表明，βγ-CAT 能够以囊泡化的方式被 HUVEC 内吞入胞，并迅速运输到细胞核中调节细胞的基因表达。基因表达谱芯片分析发现大量的转录因子和细胞因子，金属蛋白酶被激活，例如 Kruppel-like factor 4，activating transcription factor 3，TNF-α，interleukin 1β, interleukin 6，matrix metalloproteinases 9 和 12 等。在不同的剂量下，能够引起 HUVEC 不同的生物学效应。在低剂量下(25—50 pmol/L)，βγ-CAT 能够引起 HUVEC 细胞的伤口修复和细胞迁移；在高剂量下(5—100 nmol/L)，βγ-CAT 能够诱导 HUVEC 发生脱落和选择性凋亡，提示βγ-CAT 可能作为一类调节蛋白(Liu et al，2008)。本研究中，实验结果表明βγ-CAT 对肿瘤细胞也表现出复杂的生物学活性。βγ-CAT 能够选择性的杀伤多种肿瘤细胞，不同的肿瘤细胞株对βγ-CAT 的敏感性表现出很大的差异，其中结肠癌细胞 HCT116 最敏感，其 CC_{50} 约为 3 nmol/L，肿瘤细胞 AGS，Hacat，A375，K562 对βγ-CAT 的敏感度很低(如图 4 所示)。在体外βγ-CAT 能够浓度依赖(5—100 nmol/L)的诱导贴壁的肿瘤细胞 HCT116，HT29 和 A375 发生脱落，其中 HCT116 最敏感，HT29 和 A375 的敏感性较差(如图 5 所示)。流式细胞仪分析表明，βγ-CAT 能够诱导 HCT116 细胞发生经典的细

胞凋亡效应，随着剂量增加，HCT116 凋亡的细胞数目增加，并可以观察到大量的凋亡小体产生。Caspases 活性检测结果表明，在βγ-CAT 处理的HCT116细胞中，细胞凋亡中起关键作用的Caspases (Kumar，2007)被显著性的激活(如图 6 所示)，例如线粒体凋亡途径(内源性途径)上的关键分子Caspase-9 (Degterev et al，2003；Fuentes-Prior and Salvesen，2004)和 TNF-a 家族成员启动的细胞凋亡的途径上的关键分子 Caspase-8(Boldin et al，1996；Muzio et al，1996)。比较βγ-CAT 在肿瘤细胞和HUVEC 上引起的生物学效应，发现存在很多相似之处。因此，结合分析上述实验结果，我们推测βγ-CAT 在高等哺乳动物有核细胞中可能的作用机制为：βγ-CAT 在细胞膜上通过孔道形成作用，诱导细胞将βγ-CAT 内吞入胞；通过泛素化修饰(很有可能为单泛素化修饰)，为βγ-CAT 提供向细胞核定向转运的信号；βγ-CAT 可能通过其具有的 ATPase 活性为细胞内的快速转运提供能量；βγ-CAT 被转运进入细胞核后，通过其具有的 GTPase 活性和核苷酸结合活性来实现其调节基因的表达，激活多种转录因子，分泌产生大量的细胞因子，从而调节细胞的生理功能，产生不同的细胞效应，如脱落，迁移和选择性凋亡。因此，下一步的相关研究将通过各种实验验证这些假设。

高等哺乳动物中非晶状体βγ-晶状体蛋白黑色素瘤缺失蛋白 AIM1 在体内以基因家族的形式存在，目前研究提示黑色素瘤缺失蛋白 AIM1 在胚胎发育，抑制恶性皮肤肿瘤具有重要的作用。但是，由于其表达量低和结构特殊，对其生化特性, 生物学功能和分子作用机制的相关信息了解尚少 (Ray et al，1997；Teichmann et al，1998)。三叶因子蛋白在哺乳动物中参与了粘膜保护，损伤修复和肿瘤抑制等重要生理过程，但是对于与其相互作用的靶蛋白分子和下游信号转导通路存在很大的争议，其详细的分子作用机制目前还不清楚。Erspamer 曾经预测两栖动物皮肤中的活性蛋白和多肽在高等哺乳动物中都能找到类似物。这一论断被越来越多的实验证据所支持，很多两栖动物皮肤中的活性蛋白和多肽作为研究模型和前导分子，为研究高等哺乳动物中类似分子的生理功能和分子作用机制提供了线索和巨大贡献，例如 BV8 和 Bradykinin (Bevins & Zasloff，1990)。本文第一次报道 βγ-CAT 在体外具有潜在的 GTP/ATPase 和 GTP/ATP 结合活性。通过Western blot 分析和激光共聚焦显微镜观察，发现βγ-CAT 在向 HUVEC 的细胞核转运过程中，其α亚基和β亚基参与形成约 150 kDa 的大分子复合物，部分泛素化修饰信号和βγ-CAT 的α亚基和β亚基的抗体荧光信号分别重合，分布于细胞内和融合于细胞核区域的转运囊泡小体中，提示泛素化修饰信号在βγ-CAT 的内吞入胞和细胞核转运的过程中可能起到重要的作用。同时，还发现βγ-CAT 能够选择性的杀伤肿瘤细胞，诱导肿瘤细胞脱落和发生凋亡。这些结果为进一步深入研究βγ-CAT 的细胞内的转运，细胞核定位和调节细胞基因表达的详细作用机制提供了线索，也为研究高等脊椎动物中非晶状体βγ-晶状体蛋白和三叶因子的生理功能和作用机制提供一个全新的视野。

参考文献：

Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay [J]. *Cancer Res*，**48**(3): 589-601.

Belting M, Sandgren S, Wittrup A. 2005. Nuclear delivery of macromolecules: barriers and carriers [J]. *Adv Drug Deliv Rev*，**57**(4): 505-527.

Bevins CL，Zasloff M. 1990. Peptides from frog skin [J]. *Annu Rev Biochem*，**59**: 395-414.

Bhat SP. 2004. Transparency and non-refractive functions of crystallins-a proposal [J]. *Exp Eye Res*，**79**(6): 809-816.

Bloemendal H. 1982. Lens proteins [J]. *CRC Crit Rev Biochem*，**12**(1): 1-38.

Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. 1996. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1 and TNF receptor-induced cell death [J]. *Cell*，**85**(6): 803-15.

Bossenmeyer-Pourié C, Kannan R, Ribieras S, Wendling C, Stoll I, Thim L, Tomasetto C, Rio MC. 2002. The trefoil factor 1 participates in gastrointestinal cell differentiation by delaying G1-S phase transition and reducing apoptosis [J]. *J Cell Biol*, **157**(5): 761-70.

Cover TL, Blanke SR. 2005. Helicobacter pylori VacA, a paradigm for toxin multifunctionality [J]. *Nat Rev Microbiol*, **3**(4): 320-332.

Degterev A, Boyce M, Yuan J. 2003. A decade of caspases [J]. *Oncogene*, **22**(53): 8543-67.

Fuentes-Prior P, Salvesen GS. 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity，activation and inhibition [J]. *Biochem J*, **384**(Pt 2): 201-32.

Ganea E. 2001. Chaperone-like activity of alpha-crystallin and other small heat shock proteins [J]. *Curr Protein Pept Sci*, **2**(3): 205-225.

Graw J. 1997. The crystallins: Genes，proteins and diseases [J]. *Biol Chem*, **378**(11): 1331-1348.

Haddad A, Bowman GR, Turkewitz AP. 2002. New class of cargo protein in Tetrahymena thermophila dense core secretory granules [J]. *Eukaryotic*

Cell, **1**(4): 583-593.

Haglund K, Di Fiore PP, Dikic I. 2003. Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis [J]. *Trends Biochem Sci*, **28**(11): 598-603.

Hauser F, Hoffmann W. 1991. xP1 and xP4-P-Domain peptides expressed in Xenopus laevis stomach mucosa [J]. *J Biol Chem*, **266**(31): 21306-21309.

Hauser F, Roeben C, Hoffmann W. 1992. Xp2, a new member of the P-domain peptide family of potential growth-factors, is synthesized in Xenopus laevis skin [J]. *J Biol Chem*, **267**(20): 14451-14455.

Hiratsuka T, Uchida K. 1973. Preparation and properties of 2'(or 3')-O-(2,4,6-trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate, an analog of adenosine triphosphate [J]. *Biochim Biophys Acta*, **320**(3): 635-47.

Inouye M, Inouye S, Zusman DR. 1979. Biosynthesis and self-assembly of protein S, a development-specific protein of Myxococcus xanthus [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**(1): 209-13.

Jaenicke R, Slingsby C. 2001. Lens crystallins and their microbial homologs: Structure, stability，and function [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **36**(5): 435-499.

Keresztes M, Boonstra J. 1999. Import(ance) of growth factors in(to) the nucleus [J]. *J Cell Biol*, **145**(3): 421-424.

Kumar S. 2007. Caspase function in programmed cell death [J]. *Cell Death Differ*, **14**(1): 32-43.

Labouvie C, Machado JC. 1997. Expression pattern of gastrointestinal markers in native colorectal epithelium, lesions, and carcinomas [J]. *Oncology Reports*, **4**(6): 1367-1371.

Ladant D, Ullmann A. 1999. Bordetella pertussis adenylate cyclase: a toxin with multiple talents [J]. *Trends Microbiol*, **7**(4): 172-176.

Lefebvre O, Chenard MP, Masson R, Linares J, Dierich A, LeMeur M, Wendling C, Tomasetto C, Chambon P, Rio MC. 1996. Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein [J]. *Science*, **274**(5285): 259-262.

Liu SB, He YY, Zhang Y, Lee WH, Qian JQ, Lai R, Jin Y. 2008. A novel non-lens betagamma-crystallin and trefoil factor complex from amphibian skin and its functional implications [J]. *PLoS ONE*, **3**(3): e1770.

Malinowski K, Manski W. 1980. An immunochemical study of the different proteins in the beta and gamma crystallin families [J]. *Exp Eye Res*, **30**(5): 519-26.

Maslov VG, Chunaev AS. 1982. Study of primary photoprocesses in photosystem II of Chlamydomonas mutant strains by hole-burning spectroscopy [J]. *Mol Biol (Mosk)*, **16**(3): 604-11.

Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex [J]. *Cell*, **85**(6): 817-27.

Mörner CT. 1893. Untersuchungen der Proteinsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges [J]. *Z Physiol Chem*, **18**: 61-106.

Narberhaus F. 2002. Alpha-crystallin-type heat shock proteins: Socializing minichaperones in the context of a multichaperone network [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, **66**(1): 64-93.

Nelson DR, Zusman DR. 1983. Transport and localization of protein S, a spore coat protein, during fruiting body formation by Myxococcus xanthus [J]. *J Bacteriol*, **154**(2): 547-53.

Ogawa M, Takabatake T, Takahashi TC, Takeshima K. 1997. Metamorphic change in EP37 expression: Members of the beta gamma-crystallin superfamily in newt [J]. *Dev Genes Evol*, **206**(7): 417-424.

Ogawa M, Takahashi TC, Takabatake T, Takeshima K. 1998. Isolation and characterization of a gene expressed mainly in the gastric epithelium, a novel member of the ep37 family that belongs to the beta gamma-crystallin superfamily [J]. *Dev Growth Diff*, **40**(5): 465-473.

Olsnes S，Klingenberg O，Wiedlocha A. 2003. Transport of exogenous growth factors and cytokines to the cytosol and to the nucleus [J]. *Physiol Rev*，83(1): 163-182.

Parker MW, Feil SC. 2005. Pore-forming protein toxins: from structure to function [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, **88**(1): 91-142.

Piatigorsky J. 1981. Lens differentiation in vertebrates. A review of cellular and molecular features [J]. *Differentiation*, **19**(3): 134-53.

Ray ME, Wistow G, Su YA, Meltzer PS, Trent JM. 1997. AIM1, a novel non-lens member of the beta gamma-crystallin superfamily, is associated with the control of tumorigenicity in human malignant melanoma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(7): 3229-3234.

Reddy GB, Kumar PA, Kumar MS. 2006. Chaperone-like activity and hydrophobicity of alpha-crystallin [J]. *Iubmb Life*, **58**(11): 632-641.

Rosinke B, Renner C, Mayr EM, Jaenicke R, Holak TA. 1997. Ca^{2+}-loaded spherulin 3a from Physarum polycephalum adopts the prototype gamma-crystallin fold in aqueous solution [J]. *J Mol Biol*, **271**(4): 645-655.

Sands BE, Podolsky DK. 1996. The trefoil peptide family [J]. *Annu Rev Physiol*, **58**: 253-273.

Sandvig K, van Deurs B. 2000. Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives [J]. *EMBO J*, **19**(22): 5943-5950.

Sandvig K, van Deurs B. 2005. Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins [J]. *Gene Ther*, **12**(11): 865-872.

Suemori S, Lynch-Devaney K, Podolsky DK. 1991. Identification and Characterization of Rat Intestinal Trefoil Factor-Tissue-Specific and Cell-Specific Member of the Trefoil Protein Family [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**(24): 11017-11021.

Takabatake T, Takahashi TC, Takeshima K. 1992. Cloning of an Epidermis-Specific Cynops Cdna from Neurula Library [J]. *Dev Growth Diff*, **34**(3): 277-283.

Taupin D, Podolsky DK. 2003. Trefoil factors: Initiators of mucosal healing [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**(9): 721-734.

Teichmann U, Ray ME, Ellison J, Graham C, Wistow G, Meltzer PS, Trent JM, Pavan WJ. 1998. Cloning and tissue expression of the mouse ortholog of AIM1, a beta gamma-crystallin superfamily member[J]. *Mamm Genome*, **9**(9): 715-720.

Thim L. 1997. Trefoil peptides: from structure to function [J]. *Cell Mol Life Sci*, **53**(11-12): 888-903.

Thim L, May FEB. 2005. Structure of mammalian trefoil factors and functional insights [J]. *Cell Mol Life Sci*, **62**(24): 2956-2973.

Tomita T, Noguchi K, Mimuro H, Ukaji F, Ito K, Sugawara-Tomita N, Hashimoto Y. 2004. Pleurotolysin, a novel sphingomyelin-specific two-component cytolysin from the edible mushroom Pleurotus ostreatus, assembles into a transmembrane pore complex [J]. *J Biol Chem*, **279**(26): 26975-26982.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**(9): 4350-4.

Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. 1982. Distantly Related Sequences in the Alpha-Subunits and Beta-Subunits of Atp Synthase, Myosin, Kinases and Other Atp-Requiring Enzymes and a Common Nucleotide Binding Fold [J]. *EMBO J*，**1**(8): 945-951.

Wang CCC, Chiang YM, Sung SC, Hsu YL, Chang JK, Kuo PL. 2008. Plumbagin induces cell cycle arrest and apoptosis through reactive oxygen species/c-Jun N-terminal kinase pathways in human melanoma A375.S2 cells [J]. *Cancer Lett*, **259**(1): 82-98.

Wistow G, Jaworski C, Rao PV. 1995. A non-lens member of the beta gamma-crystallin superfamily in a vertebrate, the amphibian Cynops [J]. *Exp Eye Res*, **61**(5): 637-639.

Wistow GJ, Piatigorsky J. 1988. Lens crystallins: the evolution and

expression of proteins for a highly specialized tissue [J]. *Annu Rev Biochem*, **57**: 479-504.

Wong WM, Poulsom R, Wright NA. 1999. Trefoil peptides [J]. *Gut*, **44**(6): 890-895.

Zhang C, Gehlbach P, Gongora C, Cano M, Fariss R, Hose S, Nath A, Green WR, Goldberg MF, Zigler JS, Sinha D. 2005. A potential role for beta-and gamma-crystallins in the vascular remodeling of the eye [J]. *Dev Dyn*, **234**(1): 36-47.

Zhang J, Zhang Y, Wan SG, Wei SS, Lee WH, Zhang Y. 2005. Bm-TFF2, a trefoil factor protein with platelet activation activity from frog Bombina maxima skin secretions [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **330**(4): 1027-1033.

Zhang Y. 2006. Amphibian skin secretions and bio-adaptive significance—Implications from Bombina maxima skin secretion proteome [J]. *Zoological Research*, **27**(1): 101-112.

[张 云. 2006. 两栖类动物皮肤分泌物及其生物学适应意义——大蹼铃蟾皮肤分泌物蛋白质多肽组的启示. 动物学研究，**27**(1): 101-112.]